

氏 名	陳 晨
学 位 の 種 類	博士（栄養科学）
学 位 記 番 号	博栄甲第 0020 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）
研 究 科 専 攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	Antiproliferative and Apoptosis-inducing Activity of Nobiletin against Three Subtypes of Human Breast Cancer Cell Lines (ノビレチンによる乳癌細胞増殖抑制およびアポトーシス 誘導作用の機序解析)
主論文公表雑誌	Anticancer Research
論文審査委員	(主査) 森山 耕成 (副査) 中野 修治 (副査) 藤田 守 (副査) 市川 純 (福岡大学 医学部) (副査) 日高 真純 (福岡歯科大学 口腔歯学部)

論文内容の要旨

ノビレチンは数種のヒト癌に対して抗がん効果を示されているが、ホルモン受容体および HER2 状態の異なる乳癌細胞に対する阻害効果およびメカニズムは不明のままである。

材料と方法：ホルモン受容体陽性 MCF-7、HER2 陽性の SK-BR-3、およびトリプルネガティブ MDA-MB-468 細胞株を使用し、ノビレチンの抗腫瘍メカニズムを検討した。

結果：ノビレチンにより各乳がん細胞の増殖は濃度依存的/時間依存的に抑制され、MDA-MB-468 細胞株において最も細胞増殖抑制効果が顕著であった。ノビレチンは ERK1/2 の活性を抑制することにより細胞周期を G0/G1 期に停止させ、同時にサイクリン D1 の抑制および p21 の増加を誘導した。ノビレチンは Bax を変化させず、Bcl-xL を減少させることによってアポトーシスによる細胞死を誘導した。AKT と下流の mTOR の活性は MDA-MB-468 細胞のみで抑制された。

結論：このようなノビレチンによる MDA-MB-468 細胞に最も強い抗腫瘍効果から、ノビレチンはトリプルネガティブ乳がんに対し、潜在的な予防効果を果たす役割が示唆される。

論文審査結果の要旨

ホルモン受容体陽性 MCF-7、HER2 陽性の SK-BR-3、およびトリプルネガティブ MDA-MB-468 細胞株を使用し、ノビレチンの増殖抑制および殺細胞効果を検討した。その結果、各細胞の増殖は、濃度依存的、時間依存的に抑制され、MDA-MB-468 細胞において顕著であった。フローサイトメータによる解析では、殺細胞効果はアポトーシスによるものが主体と考えられた。発現蛋白の抗体による検出では、ノビレチンは、ERK 活性を抑制することにより細胞周期を G₀/G₁ 期に停止させサイクリン D1 の抑制し、p21 を増加させたことが示唆された。また、Bax は変化させず、Bcl-xL を減少させていた。AKT と mTOR の活性は、MDA-MB-468 細胞のみで抑制された。したがって、ノビレチンは、トリプルネガティブ乳がんに対して予防効果と治療効果を有する可能性が示唆された。

公開審査会では、論文の内容を適切にわかりやすく提示し、質疑応答においても概ね的確に答えた。審査員合議のうえ、博士論文として適格であると判定した。

最終試験結果の要旨

申請者に対して以下の質問および意見が述べられた。

- 1) ネクロシス、アポトーシス、オートファジーなど様々な細胞死があるが、今回どのようなデータからアポトーシスと断定したのか。
- 2) 今回提示したもの以外の Bcl ファミリー蛋白の変動はどうだったか。
- 3) 用いた 3 つの乳がん細胞での p53 の働きはどうだったか。
- 4) ノビレチン濃度 100 μ M での SK-BR-3 細胞への増殖抑制効果について確認。
- 5) ノビレチンの効果は、他のトリプルネガティブ細胞株でも同様か。
- 6) HER2 陽性細胞への抑制について、ノビレチンの濃度を上げた実験は行ったか。もし実験を行うとどのような結果が出るのか。
- 7) 今回用いたもの以外の HER2 陽性細胞株はあるのか。あれば、それらの細胞で検討することにより、HER2 陽性細胞への効果といえるのではないか。
- 8) ノビレチンのがん細胞を抑制する機序についての報告はあるか。
- 9) ノビレチンは、がんの予防に効果があるのか、治療の効果があるのか。
- 10) 中国にある食品の中でノビレチンが多く含まれている食品はどのようなものか。
- 11) DMSO だけを添加した培養結果はどうであったか。
- 12) 培養中に添加物質に関わらず自然死した細胞はみられたか。

- 13) 光学顕微鏡で見てアポトーシスやネクローシスが判別できたか。
- 14) ノビレチンは、正常な乳腺細胞にも影響を及ぼすのか。
- 15) ノビレチンの細胞内への吸収の程度は測定したのか。その代謝産物は測定できたか。
- 16) 168 時間の培養期間中に培地は交換したのか。
- 17) DMSO の IC_{50} は、どの程度だったか。
- 18) 100mM ノビレチンの DMSO 溶液を培地に添加して、ノビレチンが $50\mu M - 100\mu M$ となるときの DMSO は 0.05% - 0.1%となるが、「0.05%未満では細胞に影響を及ぼさなかった」と記載された範囲を超えており、細胞に影響をおよぼしたのではないか。
- 19) アポトーシスのウェスタンブロットでノビレチン無添加の細胞と比較していないのか。
- 20) 168 時間の増殖曲線でノビレチン無添加の細胞数は培養開始時に比べて増えたのか。
- 21) 細胞周期のフローサイト解析においてノビレチン添加前に細胞周期を同期させたのか。

上記のような口頭試問を行った結果、概ね的確な解答が得られ、合格と判定した。